Bull. Soc. Myc. Fr., t. 90, fasc. 2, 1974.

LES CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES LIÉS AUX AIGUILLES DE SAPIN (*ABIES ALBA* MILL.).

1. — PREMIERS RÉSULTATS,

par F. GOURBIÈRE.

Résumé.

Les microflores fongiques liées aux aiguilles de sapin (*Abies alba* Mill.) ont été étudiées à trois stades. Les microflores isolées par culture sont très différentes :

— sur les aiguilles vertes : *Tripospermum, Dendrodochium* et *Aureobasidium.*

— sur les aiguilles récemment tombées : *Aureobasidium, Epicoccum* et *Cytospora.*

— sur les aiguilles de la couche de fermentation : *Penicillium, Trichoderma* et *Mucor.*

Ces résultats sont comparés à ceux connus chez d'autres espèces végétales.

Summary.

The fungal microflora inhabiting the needles of fir (*Abies alba* Mill.) have been studied at three stages by cultural techniques. The microflora isolated are very different :

— on living needles : *Tripospermum, Dendrodochium* and *Aureobasidium.*

— on newly fallen needles : *Aureobasidium, Epicoccum* and *Cytospora.*

— on needles of the fermentation layer : *Penicillium, Trichoderma* and *Mucor.*

This results are compared with the microflora isolated from other plant species.

*
**

Un certain nombre de travaux ont été consacrés à l'étude des populations microfongiques des litières de conifères. Par contre les champignons microscopiques présents sur les aiguilles n'ont guère retenu l'attention, en dehors des espèces pathogènes. Nous nous proposons de mettre en évidence, par l'isolement en culture, les colonisateurs fongiques des aiguilles de sapin (*Abies alba* Mill.), depuis leur apparition jusqu'à la perte de leur individualité dans le sol.

Manuscrit présenté en séance du 2 juillet 1973.

Dans ce premier travail les microflores de trois stades caractéristiques de l'existence des aiguilles sont décrites.

Matériel et méthodes.

1) *Station et matériel.*

Le matériel utilisé provient d'une sapinière (*Abies alba* Mill.) située à Tarentaise (Loire), dans le Mont Pilat, à 1 000 m d'altitude. La forêt est âgée de quatre vingts ans et régulièrement entretenue. A côté d'*Abies alba* on y rencontre quelques *Fagus sylvatica* L. et *Sorbus aucuparia* L. La strate herbacée comprend essentiellement : *Rubus* sp., *Vaccinium myrtillus* L., *Deschampsia flexuosa* L. et *Athyrium Filix-femina* Roth.

Trois types d'aiguilles ont été étudiés :

— aiguilles vertes en place sur l'arbre. Ce sont les aiguilles apparues au printemps 1971, donc âgées de cinq mois lors du premier prélèvement et de quinze mois lors du dernier. Elles ont été prélevées à deux mètres du sol environ sur les arbres adultes.

— aiguilles récemment tombées. Elles proviennent de paniers en toile plastique grillagée, préservés de tout contact avec le sol.

— aiguilles de la couche de fermentation (Kendrick et Burges, 1962) elles sont brun sombre, aplaties, parfois brisées et ont perdu leur élasticité.

Tous les prélèvements sont réalisés avec le maximum de précautions. Les aiguilles vertes sont coupées à la base, les aiguilles de la litière sont dégagées des autres débris.

Les cinq relevés ont été réalisés aux dates suivantes :

1 : 3.XI.1971
2 : 30.I.1972
3 : 1.IV.1972
4 : 12.VI.1972
5 : 18.VIII.1972.

2) *Méthodes.*

Chaque prélèvement correspond à un lot de trente aiguilles. La méthode utilisée s'inspire de celle de Dickinson (1965, 1966).

Les aiguilles sont soumises à dix lavages successifs (tubes de 22 mm de diamètre contenant 20 cc de liquide) par agitation mécanique rapide (Vortex Genie).

Les lavages sont ainsi définis :

n° 1 : 5 minutes, dans 20 cc d'eau distillée stérile.

n° 2 et 3 : 5 minutes, dans 20 cc d'eau distillée stérile additionnée de deux gouttes de Tween 80, indispensable pour mouiller la face inférieure.

n° 4 et 10 : 2 minutes, dans 20 cc d'eau distillée stérile.

Les aiguilles sont ensuite séchées sur papier filtre stérile, puis déposées sur « Pomme de terre Dextrose-Agar » (P.D.A.) en boîte de Pétri.

Les boîtes sont observées après une semaine pour les aiguilles récemment tombées et celles de la litière ; après quinze jours pour les aiguilles vertes. Toutes les colonies apparues sont repiquées sur P.D.A. pour identification.

Dans les tableaux les chiffres indiquent le pourcentage d'aiguilles où l'espèce a été isolée. Le total correspond, pour cent aiguilles, au nombre d'isolements, chaque espèce n'étant comptée qu'une fois par aiguille.

3) *Déterminations.*

Les souches isolées ont été déterminées par nos soins et par le Centraal-bureau Voor Schimmelcultures (Baarn) que nous tenons à remercier.

Plusieurs souches d'*Aureobasidium* ayant été isolées nous en donnons ici quelques rapides caractères distinctifs en culture sur P.D.A. à 20°C.

Aureobasidium sp. 1. Le champignon croît rapidement (40 mm en 10 jours) en donnant une culture brun rouille). Le milieu se colore également. Blastospores : 10-16 × 7-8 µm.

Aureobasidium pullulans (de Bary) Arnaud. Nos isolements se développent rapidement (35 mm en 10 jours). Le mycélium est d'abord clair, puis la partie centrale brunit, la marge restant claire. En fin de culture la partie centrale présente un aspect goudronneux. Le pigment ne diffuse pas dans le milieu.

Blastospores : 9-17 × 1,5-3 µm.

Aureobasidium sp. 3. La croissance est rapide (35 mm en 10 jours). Les colonies restent claires, ne brunissent pas. Blastospores : 8-23 × 3-5 µm. Elle serait proche de la précédente (C.B.S.).

Aureobasidium sp. 4. La croissance est lente (10 mm en 10 jours). La colonie est élevée, noire et goudronneuse, sauf une très faible marge blanche. Le pigment ne diffuse pas dans le milieu. Blastospores : 5 - 16 × 3 - 4 µm.

En résumé ces quatre souches d'*Aureobasidium* se distinguent par leur coloration, leur vitesse de croissance et la taille des blastospores. Deux seulement peuvent être rapportées à *Aureobasidium pullulans* (Ciferri et al., 1957 ; Wynne et Gott, 1956).

Résultats et discussion.

Entre le premier et le deuxième stade nous pouvons définir une évolution de la microflore. Par contre, le troisième stade n'offre aucun point commun avec le second. Cette discontinuité serait probablement réduite par une étude de la couche L (litière récente au sol). La microflore de la couche de fermentation sera donc discutée à part.

1) *Champignons microscopiques des aiguilles de la couche de fermentation* (Tableau I).

Kendrick (1962) a démontré que, dans le cas des aiguilles de litière de *Pinus sylvestris,* la méthode employée de notre étude con-

duit à l'isolement d'espèces à croissance rapide et à sporulation abondante. Cette constatation semble aussi valable dans le cas d'*Abies alba*. Toute une partie de la microflore nécessite, pour être mise en évidence, l'emploi d'autres techniques. Nos résultats sont donc certainement incomplets.

Les microflores fongiques ont été étudiées dans les litières d'un certain nombre de conifères, entre autres par KENDRICK (1962) chez *Pinus sylvestris* L. ; par HAYES (1965 a, 1965 b) chez *Pinus sylvestris* L., *Abies grandis* Lindley ; *Picea sitchensis* (Bongard) Carrière et par BRANDSBERG (1969) chez *Abies grandis* Lindley, *Pinus monticola* Dougl. et *Pinus ponderosa* Dougl.

TABLEAU I.

Relevés des aiguilles de la couche de fermentation.

	1	2	3	4	5	Moyenne
Trichoderma polysporum (Link ex Fr.) Rifai	53	87	7	63	27	47
Penicillium frequentans Westling	0	7	47	17	47	24
Mucor ramannianus Moell.	17	17	7	33	17	18
Trichoderma viride Pers. ex S. F. Gray	0	0	67	3	17	17
Thysanophora penicilloides (Roum.) Kendrick	10	40	17	3	0	14
Mortierella parvispora Linnemann	0	0	10	20	23	11
Penicillium janthinellum Biourge	0	0	0	0	33	7
Penicillium sp (S 24)	7	0	3	0	7	5
Absidia orchidis (Vuillemin) Hagem	13	0	0	3	3	4
Mucor hiemalis Wehm	7	7	0	7	0	4
Divers	7	3	3	10	13	7
Total	114	161	161	159	187	158

Les espèces que nous avons isolées sont principalement des Mucorales, des *Trichoderma* et des *Penicillium*, groupes présents dans tous les cas ci-dessus.

Mucor hiemalis a été isolé lors de sept études citées, *M. ramannianus* lors de six d'entre elles. Il ne s'agit pas d'espèces particulières aux litières de conifères. Elles sont fréquentes dans le sol (GILMAN, 1966) et dans les litières de feuillus (HERING, 1965) ou de plantes herbacées (PUGH, 1958 par exemple). Si les genres *Mortierella* et *Absidia* se rencontrent dans les litières de conifères comme d'ailleurs dans le sol et dans d'autres litières, ils y sont moins réguliers, moins importants et plus variables au niveau spécifique d'un cas à l'autre. Dans le cas d'*Abies alba*, *Mortierella parvispora* paraît assez abondant.

Trichoderma viride est un saprophyte banal, rencontré dans les sept litières de conifère étudiées, et dans pratiquement toutes les études de débris végétaux en décomposition. D'autres espèces sont présentes, variables selon les cas, ici *T. polysporum*.

KENDRICK et surtout HAYES et BRANDSBERG donnent des listes considérables de *Penicillium* isolés de litières de conifères. Il est probable que les méthodes employées par ces deux derniers auteurs (suspensions - dilutions d'eau de lavage et « platting » d'aiguilles sans lavage préalable) favorisent ce type de microorganismes. KENDRICK en utilisant des aiguilles lavées ou stérilisées en surface, obtient une liste de *Penicillium* plus réduite. Nous n'avons déterminé que deux espèces. L'une, *P. frequentans* apparaît dans les sept autres études de litières de conifères, mais aussi dans les litières de feuillus (HERING, 1965) et de plantes herbacées (PUGH, 1958 par exemple), et dans le sol (GILMAN, 1966). L'autre, *P. janthinellum*, si elle existe dans le sol, n'a été rencontrée qu'une fois dans une litière de conifère (*P. sylvestris*, HAYES, 1965).

Thysanophora penicillioides est décrit par KENDRICK (1961) comme caractéristique des litières de conifères. Il a été isolé chez *Abies grandis*, *Picea sitchensis*, *Pinus sylvestris* (moins souvent) mais manque chez *Pinus monticola* et *Pinus ponderosa*.

En conclusion nous avons isolé quatre espèces (*Mucor hiemalis*, *M. ramannianus*, *Trichoderma viride* et *Penicillium frequentans*) ne présentant aucune spécificité puisqu'on les rencontre aussi bien dans le sol, les litières de feuillus ou de plantes herbacées.

Les autres espèces isolées appartiennent à des genres très répandus (*Mortierella*, *Absidia*, *Trichoderma*, *Penicillium*), les espèces rencontrées variant avec le substrat, les méthodes de la localisation géographique. Seul *Thysanophora* serait un élément caractéristique des litières de conifères.

2) *Champignons microscopiques de la phyllosphère* (Tableaux II et III).

TABLEAU II.

Relevés des aiguilles vertes.

	1	2	3	4	5	Moyenne
Aureobasidium sp. 4	17	3	0	3	13	7
Dendrodochium epistomum Sacc. et Briard	0	10	0	13	7	6
Tripospermum myrti (Lind.) Hughes.	3	3	0	3	17	5
Aureobasidium pullulans (de Bary) Arnaud	17	0	0	3	3	5
Aureobasidium sp. 1	13	0	0	0	3	3
Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries	7	3	0	0	7	3
Divers	0	3	3	13	43	12
Total	57	22	3	35	93	41

Les champignons microscopiques isolés des deux premiers types de feuilles peuvent être regardés comme des hôtes de la phyllosphère. La sénescence s'accompagne d'un accroissement de la microflore, ce phénomène a été observé dans tous les cas étudiés par d'autres auteurs.

Dans cette phyllosphère nous distinguerons trois groupes de colonisateurs :

I — particuliers aux aiguilles vertes : *Aureobasidium* sp. 4, *Tripospermum myrti* et *Dendrodochium epistomum*.

II — *Aureobasidium* sp. 1, *A. pullulans* et *Cladosporium cladosporoides*, présents sur les aiguilles récemment tombées.

III — groupe propre aux aiguilles récemment tombées : *Cytospora*, *Epicoccum nigrum* et plus accessoirement *Alternaria alternata* et *Botrytis cinerea*.

Les groupes II et III, en excluant *Cytospora*, ont été retrouvés lors d'études similaires chez les végétaux très variés, avec quelques nuances au niveau spécifique. Pugh et Mulder (1971), travaillant sur *Typha latifolia*, décrivent un premier stade de colonisation des feuilles vertes par *Cladosporium herbarum* et *Aureobasidium pullulans* (cf. notre groupe II) suivi par un second stade à *Epicoccum nigrum* et *Alternaria tenuis* (cf. notre groupe III).

Tableau III.

Relevés des aiguilles récemment tombées.

	1	2	3	4	5	Moyenne
Cytospora sp.	63	47	80	23	33	49
Aureobasidium sp. 1	33	77	13	20	47	38
Aureobasidium pullulans (de Bary) Arnaud	0	27	17	47	63	31
Epicoccum nigrum Link	13	13	3	20	13	13
Alternaria alternata (Fr.) Keissl.	7	0	3	17	10	7
Aureobasidium sp. 3	0	3	7	7	0	3
Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries	3	3	3	3	3	3
Botrytis cinerea Pers. ex Fr.	3	0	0	7	0	2
Divers	7	20	7	3	3	8
Total	129	190	133	147	172	154

Chez les conifères Mc Bride (1970) a isolé, entre autres, *Cladosporium* et *Epicoccum* de la phyllosphère de *Larix decidua* ; Kendrick (1962) chez *Pinus sylvestris* ne signale, parmi les espèces que nous avons isolées, que *Cladosporium* dans les aiguilles de la litière (L).

Ces espèces ou des espèces voisines, ont encore été rencontrées sur des feuilles sénescentes de feuillus (Hering, 1965) et Friend (1965) a montré qu'elles font partie des « sooty mould » sur les feuilles et rameaux de *Tilia vulgaris*.

Ce groupe d'espèces (groupe II et III, *Cytospora* exclu) semble donc assez caractéristique des feuilles sénescentes, mais sans aucune spécificité quant à l'espèce végétale hôte.

Dans le groupe III *Cytospora* paraît plus spécifique du sapin. Kendrick (1962) signale bien un *Cytospora* « commun » dans les aiguilles de la litière (L) de *Pinus sylvestris* mais il ne lui accorde pas de rôle important. Par rapport au travail de cet auteur, notre

espèce serait plutôt équivalente à *Fusicoccum bacillare*. C'est-à-dire qu'elle représenterait chez *Abies alba* « l'espèce unique » (DICKINSON, 1966) : espèce qui se développe sur les feuilles sénescentes et qui présente une certaine spécificité d'hôte.

Sur les aiguilles vertes nous avons trouvé trois espèces (groupe I) qui se signalent d'emblée par une croissance très lente. Si elles persistaient sur les aiguilles récemment tombées leur isolement serait très hypothétique en présence des espèces à croissance rapide des groupes II et III. Leur disparition lors de la chute des aiguilles demanderait donc confirmation. En se référant au travail de KENDRICK et BURGES (1962) sur *Pinus sylvestris* elles occupent la place que ces auteurs attribuent à *Coniosporium*. Ils notent son absence en hiver et au printemps, ce qui semble être aussi le cas pour nos trois espèces chez le sapin (relevé 2 et surtout 3). L'hiver supprimerait donc la microflore des aiguilles, à localisation superficielle. L'isolement répété, et confirmé par les études en cours, de *Tripospermum myrti* est à rapprocher de son isolement par INGOLD et COX (1957) qui le rapportent aux feuilles tombées de Sycomore et d'Aulne.

Ce groupe I ne semble pas exister dans le cas des feuilles annuelles (DICKINSON, 1966, sur *Pisum* ; HOLLOMON, 1967, sur *Solanum* ; DIEM, 1967, sur *Hordeum* ; DICKINSON, 1965, sur *Halimione* ; PUGH et MULDER, 1971, sur *Typha*). Ces auteurs font en effet commencer la colonisation de la phyllosphère par notre groupe II.

DICKINSON (1966) a émis l'hypothèse que dans le cas des feuilles annuelles, la durée de la végétation ne permettait pas l'établissement d'une microflore et il envisageait que l'étude d'espèces à feuilles persistantes pourrait apporter de nouveaux éléments. D'après nos premiers résultats il semble qu'il existe sur les aiguilles vertes d'*Abies* une microflore fongique, certes réduite, mais bien différente de celle qui se développera à la chute des aiguilles.

CONCLUSION.

Cette étude nous a pemis de décrire trois microflores fongiques associées aux aiguilles de sapin. Il semble que la longue existence des aiguilles vertes y permettent l'installation d'une microflore particulière (*Dendrodochium, Tripospermum* et *Aureobasidium* sp. 4), associée à des espèces qui se développeront largement lors de la chute des aiguilles (*Aureobasidium* sp. 1, *Cladosporium, Aureobasidium pullulans*).

En effet, celle-ci s'accompagne d'un développement considérable de la microflore avec certaines espèces nouvelles (*Epicoccum, Cytospora, Alternaria*). Sur les aiguilles de la couche de fermentation la microflore est entièrement renouvelée et, avec des espèces des genres *Penicillium, Trichoderma, Mucor,* se rapproche de celle des sols.

Nous nous attachons actuellement à l'étude plus précise de l'évolution de ces microflores jusqu'à la chute des aiguilles et de leur rôle dans l'écosystème forestier (dégradation de substances avant l'arrivée au sol).

BIBLIOGRAPHIE.

BRANDSBERG (J. W.). — Fungi isolated from decomposing conifer litter. *Mycologia,* 61, 373-381, 1969.

CIFERRI (R.), RIBALDI (M.) and CORETE (A.). — Revision of 23 strains of *Aureobasidium pullulans* (de By.) Arn. (= *Pullularia pullulans*). *Atti. Ist. Bot. Univ. Pavia,* lab. Critt., 14, 78-90, 1957.

DICKINSON (C. H.). — The mycoflora associated with *Halimione portulacoides*. III. Fungi on green and moribund leaves. *Trans. Br. Mycol. Soc.,* 48 (4), 603-610, 1965.

DICKINSON (C. H.). — Fungal colonization of *Pisum* leaves. *Can. J. Bot.,* 45, 915-927, 1966.

DIEM (H. G.). — Microorganismes de la surface des feuilles. I. Observations préliminaires de la population microbienne de l'Orge. *Bull. Ecol. nat. sup. Agron. Nancy,* 9, 102-108, 1967.

FRIEND (R. J.). — A study of sooty mould on lime trees (*Tilia vulgaris*). *Trans. Br. Mycol. Soc.,* 48 (3), 367-370, 1965.

GILMAN (J. C.). — *A manual of soil fungi*. The lowa State University Press, 450 p., 1957.

HAYES (A. J.). — Some microfungi from Scots pine litter. *Trans. br. Mycol. Soc.,* 48 (2), 179-185, 1965 a.

HAYES (A. J.). — Studies on the decomposition of coniferous leaf litter II. Changes in external features and succession of microfungi. *J. Soil. Science,* 16 (2), 242-257, 1965 b.

HERING (T. F.). — Succession of fungi in the litter of a lake district oakwood. *Trans. Br. Mycol. Soc.,* 48 (3), 391-408, 1965.

HOLLOMON (D. W.). — Observations on the phyllophane flora of potatoes. *Eur. Potato. J.,* 10 (1) ; 53-61, 1967.

INGOLD (C. T.) and COX (V. J.). — On *Tripospermum* and *Campylospora*. *Trans. Br. Mycol. Soc.,* 40 (3), 317-321, 1957.

KENDRICK (W. B.). — Hyphomycetes of conifer leaf litter. *Thysanophora* gen. nov. *Can. J. Bot.,* 39, 817-832, 1961.

KENDRICK (W. B.). — Fungi associated with breakdown of pine leaf litter in the organic horizon of a podzol. *Mycopath. et Myco. Appl.,* 19 (3) ; 241-245, 1962.

KENDRICK W. B.) and BURGES (A.). — Biological aspects of the decay of *Pinus sylvestris* leaf litter. *Nova Hedwigia,* 4, 313-342, 1962.

MC BRIDE (R. P.). — *The phyllosphere of european larch* (*Larix decidua* Mill.). *A microecological study of leaf infection*. Ph. D. Thesis, University of Edinburg, 1970.

PUGH (G. J. F.). — Leaf litter fungi on *Carex Paniculata* L. *Trans. Br. Mycol. Soc.,* 41 (2), 185-195, 1958.

PUGH (G. J. F.) and MULDER (J. L.). — Mycoflora associated with *Typha latifolia*. *Trans. Br. Mycol. Soc.,* 57 (2), 273-282, 1971.

WYNNE (E. S.) and GOTT (C. L.). — A proposed revision of the genus *Pullularia*. *J. gen. microbiol.,* 14, 512-519, 1956.

(*Laboratoire d'Ecologie, Département de Biologie Végétale, 69 - Villeurbanne*).